

بررسی پروفایل بیانی miRNAهای اگزوزومی در سلول‌های سرطانی سرویکس (HeLa) در مقایسه با سلول‌های سالم و بررسی ژن‌های کلیدی وابسته به آنها

مرضیه نادری بلداجی^۱، دکتر کامبیز احمدی^۲، دکتر سمیه رئیسی^{۳*}

۱. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. استادیار گروه علوم کامپیوتر، دانشکده علوم ریاضی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳. دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹

خلاصه

مقدمه: سرطان سرویکس، چهارمین سرطان شایع در میان زنان در سرتاسر جهان و یک بیماری هتروژن می‌باشد. miRNAهای اگزوزومی می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای تشخیصی و یا اهداف درمانی در سرطان سرویکس در نظر گرفته شوند. مطالعه حاضر با هدف استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای شناسایی miRNAها، ژن‌ها و مسیرهای مربوط به آنها در اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول سرطانی سرویکس انجام شد.

روش کار: در این مطالعه، بیان miRNAها و mRNAهای اگزوزومی در سلول‌های هلا و سالم با آنالیز داده‌های به‌دست آمده از پایگاه GEO برای miR-seq و RNA-seq در نرم‌افزار R (نسخه ۴،۲،۱) بررسی شد. پس از آن ژن‌های مشترک میان هدف‌های miRNA و mRNA با بیان کاهش یافته یا افزایش یافته، از اگزوزوم‌ها انتخاب شدند و سپس آنالیزهای GO و مسیرهای KEGG انجام شد. در پایان، ژن‌های مشترک برای ایجاد شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین و انتخاب ژن‌های کلیدی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر، ۳۱ miRNA با افزایش بیان و ۱۶ miRNA با کاهش بیان در اگزوزوم‌ها مشاهده شد. همچنین ۳۴۱ ژن مشترک از هدف‌های miRNA و RNA-seq برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. آنالیز GO نشان داد که ژن‌های مشترک به‌طور معناداری در انتقال لوسین، فعالیت فسفاتازی MAP کیناز و انتقال گلوتامین نقش دارند. آنالیز KEGG نیز پیش‌بینی کرد که ژن‌ها در پیری سلولی، مسیر پیام‌رسانی p53 و سیکل سلولی به‌صورت معناداری نقش دارند. ۱۰ ژن کلیدی شامل CENPA، CCNB1، BUB1، BIRC5، FOXM1، MKI67، KIF20A، GINS2، ZWINT، NCAPH و ASF1B از شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج شامل شناسایی miRNAهای با تغییر بیان و مشخص کردن ژن‌های کلیدی در اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های سرطانی سرویکس بود. این مطالعه می‌تواند دیدگاه جدیدی را برای تعیین مکانیسم‌های بالقوه همراه با اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های سرطانی در پیشرفت سرطان سرویکس ارائه کند.

کلمات کلیدی: اگزوزوم، بیومارکر، سرطان سرویکس، مسیرهای پیام‌رسانی، miRNA، mRNA

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سمیه رئیسی؛ دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۱۹، پست الکترونیک: s.reisi@sku.ac.ir

مقدمه

سرطان سرویکس یا دهانه رحم^۱، چهارمین سرطان شایع در میان سرطان‌های زنان و یکی از موارد شایع مرگ‌ومیر در زنان زیر ۴۵ سال، بعد از سرطان پستان، ریه، تخمدان و کولورکتال می‌باشد (۱). عوامل مختلفی در ایجاد سرطان سرویکس نقش دارند که شامل: عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)^۲، سن، سیگار کشیدن، زایمان، تعداد بیشتر شرکای جنسی، استفاده از برخی روش‌های پیشگیری از بارداری، سرکوب مزمن سیستم ایمنی و رژیم غذایی می‌باشند (۲). ترکیب جراحی و غربالگری، به‌طور مؤثری سبب افزایش پیش‌آگهی بیماران می‌شود. با این وجود، پیشگیری از عود و متاستاز سرطان سرویکس دشوار است و منجر به مرگ‌ومیر بالایی در بین زنان می‌شود (۳). متاستاز به گره‌های لنفی، به‌عنوان یک مسیر اصلی پخش شدن سلول‌های سرطانی، مسئول پیامدهای بالینی در مراحل اولیه سرطان سرویکس می‌باشد. در میان عوامل متعددی که سبب متاستاز می‌شوند، ریزمحیط توموری که سبب تسهیل در توزیع سلول‌های تومور می‌شود، نقش مهمی در متاستاز دارد. در این میان رگ‌های لنفاوی نقش خیلی مهمی را بر عهده دارند (۴). در کنار این عوامل، فاکتورهای دیگری در سطح سلولی و مولکولی می‌توانند به پیشرفت سرطان سرویکس کمک کنند. در این راستا، فاکتورهای اپی‌ژنتیکی مانند miRNAها، circRNAها و lncRNAها می‌توانند نقش قابل توجهی در فرآیندهای بیولوژیکی وابسته به پاتوژنز سرطان سرویکس داشته باشند (۵).

microRNA (miRNAs) یک کلاس از RNAهای کوچک و غیرکدکننده و فوق‌العاده حفاظت شده با طول حدود ۲۰-۲۲ نوکلئوتید هستند که بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی را توسط تنظیم پس از رونویسی و ترجمه mRNA کنترل می‌کنند. در این حالت miRNA با ناحیه 3'UTR مربوط به mRNA هدف جفت می‌شود و بیان آن را به‌طور منفی تحت تأثیر قرار می‌دهد. این عملکرد سبب می‌شود رونوشت ژن هدف

تجزیه شده و یا ترجمه آن مهار شود (۶، ۷). تعداد زیادی از miRNAها در گردش خون یافت می‌شوند که به‌دلیل پایداری بیشتر در برابر تجزیه شدن، می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی در نظر گرفته شوند. یکی از مکانیسم‌های افزایش پایداری miRNAها، کپسوله کردن آنها در وزیکول‌های خارج سلولی به نام اگزوزوم‌ها هستند (۸).

اگزوزوم‌ها، عضوی از جمعیت ناهمگون میکروزیکول‌های خارج سلولی با قطری در حدود ۱۰۰-۴ نانومتر می‌باشند (۹)، و در انواع مختلفی از سلول‌های پستانداران به شکل وزیکول‌های چندگانه در فضای داخل سلولی وجود دارند و یا از طریق ادغام با غشای پلاسمایی، به خارج از سلول و یا به درون مایعات زیستی مانند مایع مفصلی، مایع آمنیوتیک، پلاسما، مایع مغزی نخاعی، ادرار، بزاق، شیرمادر، مایع آلوئولی، مایع فولیکولی و صفرا ترشح می‌شوند (۱۰، ۱۱). اگزوزوم‌ها ممکن است بر اساس منشأ سلولی و وضعیت فیزیولوژیکی خاص آنها، مارکرهای سطحی مختلفی را دارا باشند. آنها حاوی انواع مختلفی از پروتئین‌های اختصاصی سلول/بافت، RNAها، چربی‌ها و بیومولکول‌های زیستی هستند (۱۲). سلول‌های سرطانی معمولاً اگزوزوم‌های بیشتری نسبت به سلول‌های طبیعی تولید می‌کنند و اگزوزوم‌ها بر نئوپلازی، رشد و متاستاز تومور، سندرم‌های پارائوپلاستیک و مقاومت به درمان تأثیر می‌گذارند (۱۳). mRNAها و microRNAها در اگزوزوم‌ها شناسایی شده‌اند و این miRNAهای اگزوزومی، نقش مهمی در پیشرفت بیماری دارند و می‌توانند رگرایی را تحریک کنند و متاستاز را در سرطان‌ها تسهیل کنند (۱۴).

آنالیز توالی‌های ترانسکریپتوم می‌تواند دیدگاه‌های مفیدی را در مورد مکانیسم‌های بیماری و همچنین اهداف درمانی بالقوه ارائه دهد. برای مثال تجزیه و تحلیل توالی‌های RNA می‌تواند ژن‌هایی را شناسایی کند که در افراد دارای سرطان بیان می‌شوند و این ژن‌ها به‌عنوان هدف‌های درمانی باشند؛ به این معنی که با مهار یا تقویت تولید این ژن‌ها بر روی بهبود بیماری مؤثر باشند. در حالت دیگر، این تجزیه و تحلیل می‌تواند منجر به توسعه پزشکی شخصی و توسعه درمان‌های شخصی

¹ Cervical cancer

² Human papillomavirus

استفاده شد. در ابتدا miRNAهای دارای تفاوت بیان (DEmiRNA) بین اگزوزوم‌های نمونه سرطانی و کنترل سالم غربالگری شدند. میزان حد آستانه برای غربالگری معناداری $p < 0.01$ و $|\log_2FC| > 5$ در نظر گرفته شد. علاوه بر این به منظور مشخص کردن ژن‌های دارای تغییر بیان مربوط به داده RNA-seq حد آستانه غربالگری، معناداری $p < 0.05$ و $|\log_2FC| > 2$ تعیین شد. در نهایت با استفاده از بسته EnhancedVolcano در نرم‌افزار R، نمودارهای آتشفشانی برای DEmiRNA و DEGها رسم شد.

مشخص کردن ژن‌های هدف DEmiRNA

بعد از تعیین DEmiRNAهای با تغییر بیان بالاتر و پایین‌تر از 5، ژن‌های هدف آن‌ها مشخص شد. برای مشخص کردن ژن‌های هدف از پایگاه‌های داده TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/),

miRmap (<https://mirmap.ezlab.org/>),

miRDB (<http://www.mirdb.org/>) و

miRwalk ([http://mirwalk.umm.uni-](http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)

[heidelberg.de/](http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)) استفاده شد و ژن‌های هدف

مشترک که در هر 4 پایگاه داده دارای امتیاز بودند،

انتخاب شدند. در مرحله بعد با رسم نمودار Venn،

ژن‌های همپوشان میان ژن‌های هدف در مرحله قبل و

DEGها مشخص شدند.

آنالیز غنی‌سازی ژن‌های هدف

با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی آنالیز Enrichr،

مسیرهای KEGG³ و هویت‌شناسی ژنی (GO⁴) برای

ژن‌های همپوشان در مرحله قبل مشخص شد.

Enrichr یک پلتفرم اصلی متصل به چندین کتابخانه

مهندسی ژنتیک جداگانه می‌باشد که برای یافتن اثرات

یک ژن در طول ژنوم کامل جستجو انجام می‌دهد. علاوه

بر این، آنالیز GO شامل فرآیندهای بیولوژیکی،

عملکردهای مولکولی و اجزای سلولی نیز در این پایگاه

داده انجام شد. به این منظور، ژن‌های همپوشان به‌دست

شود؛ به این معنا که ممکن است هر فرد یک ژن خاص را بیان کرده و درمان مطابق با مشخصات ژنتیکی فرد تنظیم شود. کشف نشانگرهای زیستی، یک جنبه مهم در تجزیه و تحلیل RNA است. این تجزیه و تحلیل می‌تواند بیومارکرهایی را شناسایی کند که در جهت تشخیص یا پیشرفت بیماری استفاده شوند. بیومارکرهای زیستی همچنین می‌توانند برای پیش‌بینی پاسخ به درمان نیز مورد استفاده قرار بگیرند و امکان توسعه درمان‌های مناسب را فراهم کنند.

بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی miRNAهای دارای تغییر بیان در داده‌های به‌دست آمده از miRNA-seq و همچنین بررسی داده‌های RNA-seq با هدف یافتن مسیرهای مرتبط با آنها در جهت شناسایی بیومارکرهای احتمالی جدید و همچنین مسیرهای احتمالی در پاتوژنز سرطان سرویکس انجام شد.

روش کار

جمع‌آوری داده پروفایل بیانی

دو پروفایل بیانی جداگانه مربوط به اگزوزوم‌های جدا شده از سلول‌های سرطانی سرویکس (HeLa) و سلول‌های سالم اپی‌تلیالی سرویکس (Hcer) با کدهای GSE128803-miR-seq و RNA-seq با پروفایل GSE89926 از پایگاه داده GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) دریافت

شدند. پلتفرم استفاده شده برای انجام آزمایش بررسی

miRNA و RNA شامل GPL17303 و

GPL16791 بود. نمونه‌های موجود در بررسی miR-

seq شامل سه تکرار مربوط به سلول سرطانی سرویکس

و سه تکرار مربوط به سلول سالم بود. برای بررسی

RNA-seq نیز 2 نمونه برای سلول‌های HeLa و دو

نمونه سلول سالم بود.

غربالگری miRNAها (DEmiRNA¹) و ژن‌های

(DEGs²) با تغییر بیان

به‌منظور آنالیز داده‌های miRNA-seq و RNA-seq

از بسته limma مربوط به نرم‌افزار R (نسخه 4.2.1)

³ Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

⁴ Gene Ontology

¹ Differential expression miRNA

² Differential expression of genes

آمده در پایگاه داده وارد شدند و آنالیزهای غنی‌سازی به‌دست آمد.

شبکه میانکنش پروتئین- پروتئین و بررسی ژن- های کلیدی

میانکنش پروتئین-پروتئین (PPI)^۱ به میانکنش بین پروتئین‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی اشاره می‌کند. پایگاه داده STRING (the Retrieval of Interacting Genes, <https://string-db.org/>) یک ابزار مبتنی بر وب می‌باشد که برای ارزیابی اطلاعات شبکه PPI ایجاد شده است. به همین منظور ابتدا ژن‌های همپوشان به‌دست آمده در مرحله قبل در سایت STRING فراخوانی شده و سپس شبکه به‌دست آمده، توسط نرم‌افزار Cytoscape (نسخه ۳٫۹٫۱) مشاهده شد. همچنین افزونه CutoHabba در نرم‌افزار برای مشخص کردن ژن‌های کلیدی در شبکه با بالاترین امتیاز استفاده شد.

تأیید و بررسی سطح بیان ژن‌های کلیدی

پایگاه داده GEPIA^۲ (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) یک ابزار تعاملی آنلاین برای آنالیز داده‌های بیانی RNA-seq از تعداد بسیار زیادی نمونه توموری و سالم از پایگاه TCGA^۳ (پایگاه اطلس ژنومی سرطان) و پروژه‌های GTEx^۴ (پروژه‌های بیانی ژنوم بافتی) است. پایگاه داده GEPIA، آنالیز اختلاف بیانی میان نرمال و سرطانی را ارائه می‌دهد. بنابراین در مطالعه حاضر برای مشخص کردن تفاوت بیانی ژن‌های کلیدی در نمونه سرطانی و سالم از این پایگاه داده استفاده شد.

شناسایی داروهای کاندید مسیرهای ژنی

آنالیز میانکنش بین ژن- دارو برای ژن‌های کلیدی توسط پایگاه داده DGIdb (<https://dgidb.org/>) انجام شد. پایگاه DGIdb، یک منبع وب برای فراهم کردن اطلاعات در خصوص ژن‌های وابسته به داروهای تأیید شده و یا ترکیبات درمانی احتمالی می‌باشد. ژن‌های

کلیدی در پایگاه داده وارد شدند تا داروهای میانکنش دهنده با این ژن‌ها پیش‌بینی شوند.

توصیف و تحلیل‌های آماری

آنالیز آماری مطالعه توسط نرم‌افزار R انجام شد. در این آنالیز بعد از فراخوانی داده‌های موردنظر در نرم‌افزار، به‌منظور حذف داده‌های بدون بیان یا دارای بیان صفر و داده‌های نامناسب، نرمال‌سازی و فیلتر کردن داده‌ها توسط روش CPM^۵ انجام شد. بعد از انجام پاک‌سازی و نرمال‌سازی داده‌ها، بر روی داده‌ها miR-seq و RNA-seq آنالیز تفاوت بیان انجام شد و حد آستانه برای آنالیز با معناداری کمتر از ۰/۰۱ و $|\log_2FC| > 5$ برای miRNA و همچنین معناداری کمتر از ۰/۰۱ و لگاریتم تغییر بیان بزرگ‌تر از ۲ و کوچک‌تر از -۲ ($|\log_2FC| >$) برای ژن‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی داده‌های miR-seq و RNA-seq و مشخص کردن تغییرات بیان

قبل از انجام فرآیند آنالیز تفرق بیان ژن‌ها و miRNAها، بررسی کیفیت و نرمال‌سازی انجام شد. به‌منظور نمایش بررسی کیفیت داده‌ها، نمودار چگالی^۶ برای توزیع داده‌ها در دو حالت داده‌های خام و فیلتر شده، رسم شد. قله‌های مربوط به نمودار چگالی به نمایش مکانی که مقدارهای نمونه‌ها در آنجا متمرکز هستند، کمک می‌کند. شکل ۱- الف و ب این نمودارها را به‌ترتیب در خصوص داده‌های RNA-seq و miR-seq نشان می‌دهد. علاوه بر این، فیلتر کردن داده‌ها سبب حذف داده‌های با مقدار صفر می‌شود و آنها را در آنالیزهای بیانی وارد نمی‌کند. علاوه بر نمودار چگالی برای مشخص شدن انجام نرمال‌سازی نمودار جعبه‌ای برای داده‌های خام و نرمال‌شده مربوط به RNA-seq (شکل ۱- ج) و miR-seq (شکل ۱- د) رسم شد.

¹ Protein-protein interaction

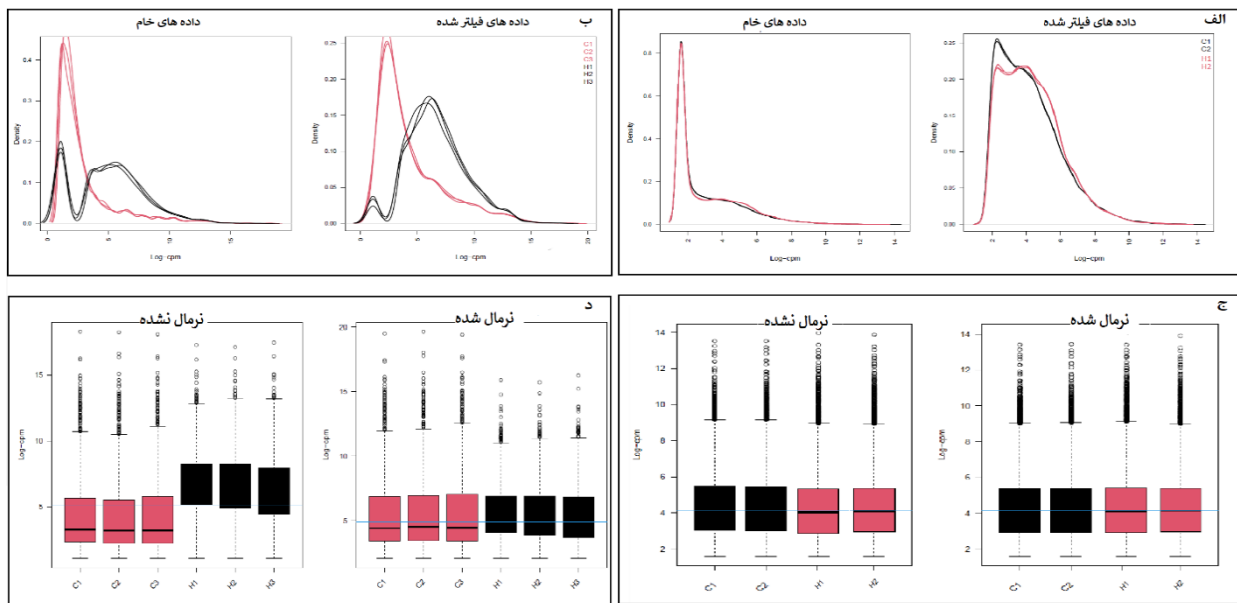
² Gene Expression Profiling Interactive Analysis

³ The Cancer Genome Atlas

⁴ The Genotype-Tissue Expression

⁵ Counts per million

⁶ Density plot



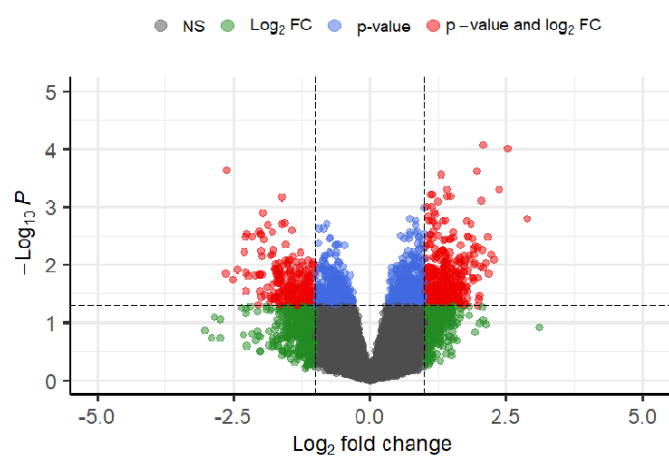
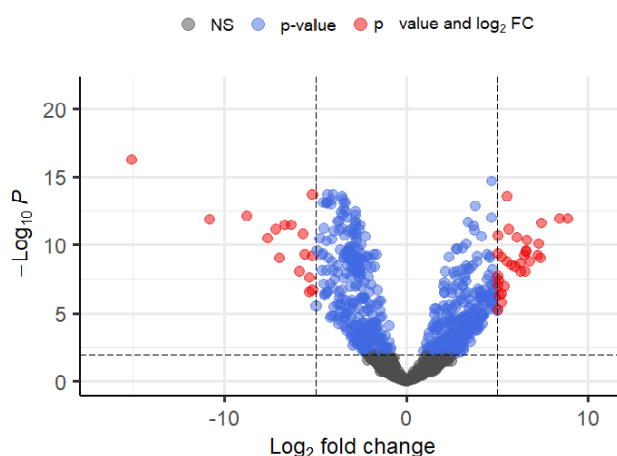
شکل ۱- نمودارهای بررسی کیفیت و نرمال‌سازی داده‌های مورد بررسی - الف) نمودار چگالی توزیع نمونه‌های مربوط به داده‌های RNA-seq در دو حالت قبل و بعد از فیلتر کردن داده‌ها. ب) نمودار چگالی توزیع نمونه‌های مربوط به داده‌های miR-seq در دو حالت قبل و بعد از فیلتر کردن داده‌ها. ج) نمودار جعبه‌ای نمونه‌های RNA-seq برای داده‌های خام و نرمال شده. د) نمودار جعبه‌ای نمونه‌های miR-seq به صورت خام و نرمال شده.

تعداد ۳۱ و ۱۶ از miRNA به ترتیب دارای افزایش و کاهش بیان بودند. نمودارهای آتشفشانی در شکل ۲ برای داده‌های آنالیز شده رسم شد که نقاط قرمز رنگ در این نمودارها، موارد دارای تفرق بیان را نشان می‌دهد.

با توجه به آنالیز انجام شده، برای mRNA-seq، تعداد ۱۷۳۱ ژن با تغییر بیان (۷۷۱ با افزایش بیان و ۹۶۰ با کاهش بیان) غربالگری شد. همچنین برای miR-seq نیز تعداد ۴۷ miRNA با تفرق بیان مشخص شد که

ب

الف



شکل ۲- الف) نمودار آتشفشانی مربوط به آنالیز داده‌های miR-seq. نقاط قرمز رنگ نشان‌دهنده miRNAهای با p-value کمتر از ۰٫۰۱ و $|\log_2 FC| > 5$ هستند. ب) نمودار آتشفشانی مربوط به آنالیز داده‌های mRNA-seq. نقاط قرمز رنگ نشان‌دهنده ژن‌های با p-value کمتر از ۰٫۰۱ و $|\log_2 FC| > 2$ هستند.

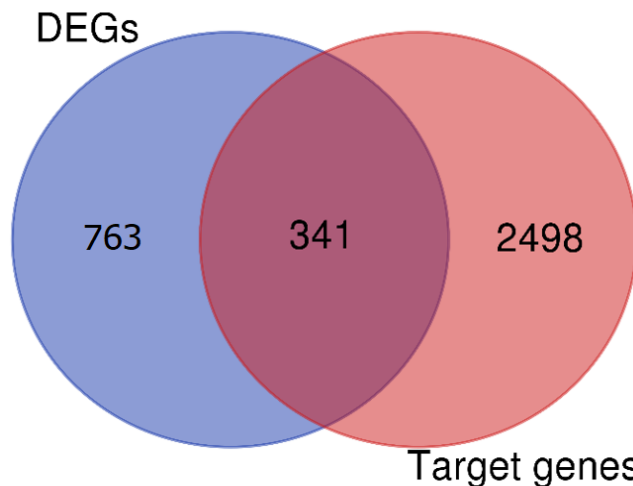
پیش‌بینی ژن‌های هدف

پس از آنالیز داده‌های مربوط به miRNA از نمونه‌های اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های هلا، تعداد ۱۶ miRNA با کاهش بیان و ۳۱ miRNA با افزایش بیان غربالگری شد. جدول ۱، تعداد ۱۰ miRNA با بیشترین مقدار تغییر بیان در هر گروه را نشان می‌دهد. در مرحله بعد، ژن‌های هدف مربوط به این miRNAها مورد بررسی قرار گرفت. برای انتخاب ژن‌های هدف با استفاده از پایگاه‌های داده اختصاصی، ابتدا miRNAهای دارای تغییر بیان به صورت جداگانه در سایت‌هایی که قبلاً در روش کار آورده شده‌اند، وارد شدند و سپس ژن‌های هدف به دست آمده از پایگاه‌های متفاوت از طریق نمودار Venn به منظور جدا کردن

هدف‌های مشترک انتخاب شدند. برای miRNAهای با کاهش بیان تعداد ۷۹۴۷ ژن هدف پیش‌بینی شد و در خصوص miRNAهای دارای افزایش بیان، تعداد ۴۷۰۲ ژن هدف پیش‌بینی شد. در مرحله بعد ژن‌های مشترک بین این دو گروه (هدف‌های دو گروه miRNA) مشخص و تعداد ۲۸۳۹ ژن انتخاب شدند. در ادامه نمودار Venn این ژن‌ها با ژن‌های دارای تفاوت بیان آنالیز شده از داده‌های RNA-seq رسم شد تا در نهایت ۳۴۱ ژن مشترک بین ژن‌های هدف و ژن‌های آنالیز شده جداسازی شد (شکل ۳). این ژن‌های مشترک برای بررسی تعاملات پروتئینی و مشخص کردن مسیرهای پیام‌رسانی مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- miRNAهای با بیشترین |log₂FC| به صورت کاهش / افزایش. در هر گروه تعداد ۱۰ miRNA با بیشترین امتیاز جدا شده است.

adj.P.Val	P.Value	B	t	Log ₂ FC	miRNA
-۱۷e۵,۵۵	-۲۰e۴,۵۱	۳۱,۴۵۱۲۸	-۳۱,۹۵۸۹۸۵	-۱۵,۰۸۳۱۲	hsa-miR-205-5p
-۱۲e۱,۴۹	-۱۴e۳,۵۰	۲۱,۴۱۷۶۱	-۱۶,۹۲۱۰۰۴	-۱۰,۸۰۲۰	hsa-miR-200c-3p
-۱۳e۷,۱۶	-۱۴e۱,۴۰	۲۲,۵۸۵۶۷	-۱۷,۶۸۸۳۹۵	-۸,۷۱۸۴۰	hsa-miR-200b-3p
-۱۱e۳,۴۲	-۱۲e۱,۶۹	۱۸,۰۶۴۴۸	-۱۳,۹۸۸۵۰۳	-۷,۵۸۴۸۰۸	hsa-miR-203b-5p
-۱۲e۷,۰۷	-۱۳e۲,۴۷	۱۹,۹۵۲۱۷	-۱۵,۳۸۶۵۲۶	-۷,۱۴۴۰۰۵	hsa-miR-203a-3p
-۱۰e۹,۸۱	-۱۱e۹,۲۹	۱۴,۷۰۵۵۸	-۱۱,۴۰۴۳۸۵	-۶,۹۳۶۶۸۷	hsa-miR-141-3p
-۱۲e۳,۶۰	-۱۳e۱,۱۱	۲۰,۸۶۱۱۵	-۱۵,۹۹۸۷۵۴	-۶,۶۵۱۷۷	hsa-miR-708-5p
-۱۲e۳,۳۷	-۱۴e۹,۸۶	۲۱,۱۶۴۵۹	-۱۶,۰۹۲۲۲۸	-۶,۲۸۰۵۹۹	hsa-miR-429
-۹e۸,۶۸	-۹e۱,۱۱	۱۲,۰۴۹۹۲	-۹,۹۸۸۲۴۰۸	-۵,۸۴۲۵۷	hsa-miR-200b-5p
-۱۱e۱,۶۹	-۱۳e۷,۴۰	۱۹,۳۲۷۱۱	-۱۴,۵۷۶۸۰۱۸	-۵,۶۳۴۷۸۳	hsa-miR-149-5p
-۱۲e۱,۲۶	-۱۴e۲,۸۰	۲۱,۳۸۵۹۳	۱۷,۱۰۶۱۱۹	۸,۸۷۰۴۵۹	hsa-miR-3606-5p
-۱۲e۱,۲۶	-۱۴e۲,۸۷	۲۱,۶۷۱۳۸	۱۷,۰۸۳۹۵۸	۸,۴۴۸۹۸	hsa-miR-6747-3p
-۱۲e۲,۷۵	-۱۴e۷,۸۳	۲۰,۹۹۳۹۳	۱۶,۲۷۳۹۴۰۱	۷,۴۳۸۳۷	hsa-miR-6717-5p
-۱۰e۹,۸۱	-۱۱e۹,۳۲	۱۴,۲۹۲۳۵	۱۱,۴۰۲۰۹۳۳	۷,۳۷۸۸۹۲	hsa-miR-4782-3p
-۱۱e۸,۸۰	-۱۲e۴,۸۶	۱۷,۱۳۹۹۱	۱۳,۲۶۸۲۰۵۷	۷,۳۱۶۸۲۰	hsa-miR-3611
-۱۰e۵,۷۹	-۱۱e۴,۵۶	۱۵,۲۰۱۹۳	۱۱,۸۳۴۲۷۳	۷,۲۵۸۳۰۲	hsa-miR-630
-۹e۱,۶۰	-۱۰e۱,۶۰	۱۳,۷۷۰۸۴	۱۱,۰۸۲۳۰۰۹	۶,۷۹۷۹۹۱	hsa-miR-4797-5p
-۱۱e۴,۵۹	-۱۲e۲,۳۸	۱۷,۸۷۱۵۳	۱۳,۷۵۵۷۶۸	۶,۶۳۵۹۴۰۷	hsa-miR-3691-5p
-۱۰e۲,۹۲	-۱۱e۱,۹۱	۱۵,۸۰۷۶۶	۱۲,۳۷۶۷۷۰	۶,۶۰۱۰۷۸۸	hsa-miR-6816-5p
-۱۰e۳,۱۶	-۱۱e۲,۱۵	۱۵,۸۰۲۱۴	۱۲,۳۰۱۰۳۴	۶,۵۹۹۸۹۶	hsa-miR-6849-5p

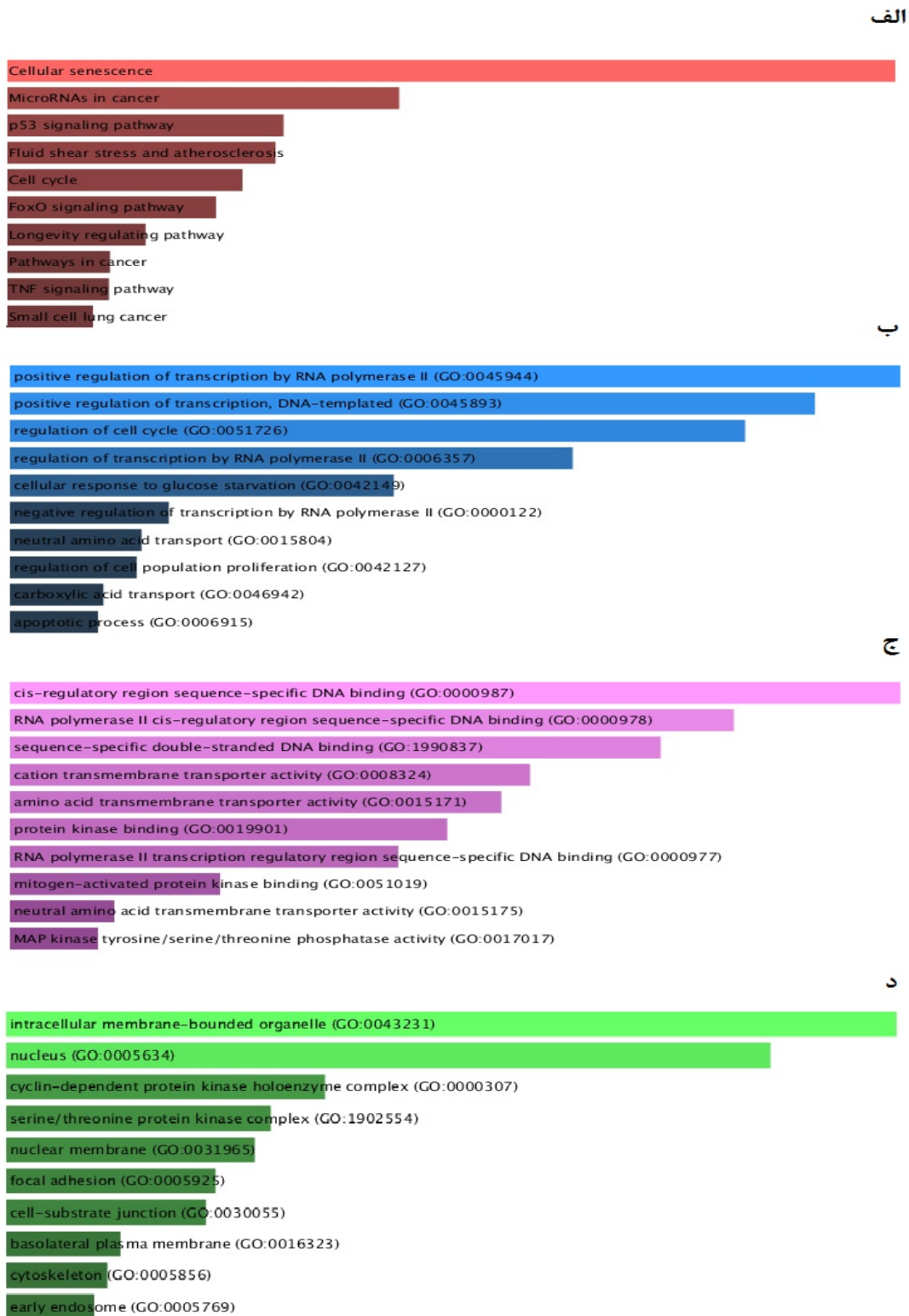


شکل ۳- نمودار Venn به منظور مشخص کردن ژن‌های مشترک میان ژن‌های هدف غربالگری شده و ژن‌های آنالیز شده. در این شکل، دایره قرمز رنگ مربوط به ژن‌های هدف miRNAهای آنالیز شده و رنگ آبی، ژن‌های با تغییر بیان در اگزوزوم‌های سلول‌های هلا است. رنگ تیره ایجاد شده در بین دو دایره، نشان‌دهنده ژن‌های مشترک می‌باشد.

نتایج مربوط به عملکردهای ژنی

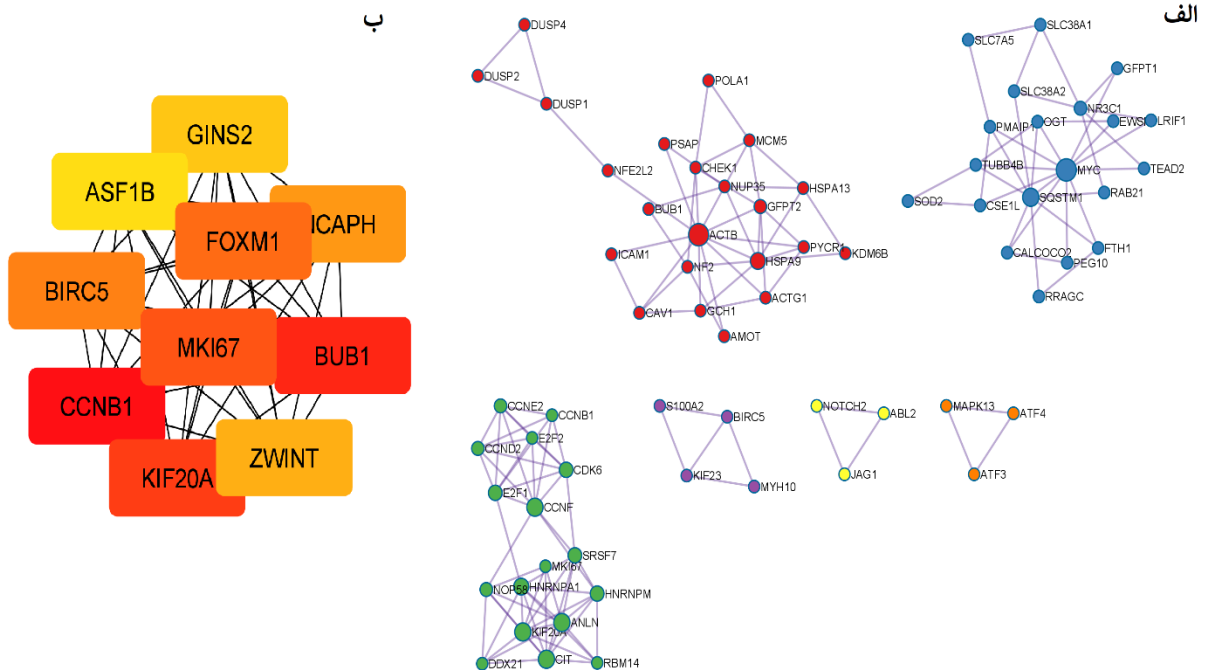
به منظور بررسی بیشتر ژن‌های مشترک در سرطان سرویکس، آنالیز GO و مسیرهای پیام‌رسانی در پایگاه KEGG انجام شد. در این بررسی، ۱۰ مسیر با بالاترین امتیاز مشخص شدند. مسیرهای پیام‌رسانی مشخص شده در پایگاه KEGG شامل پیری سلولی، microRNAها در سرطان، مسیر پیام‌رسانی p53، مسیر سیکل سلولی، مسیر پیام‌رسانی FoxO و همچنین مسیرهای مربوط به سرطان می‌باشند (شکل ۴- الف). فرآیندهای بیولوژیکی با معناداری بالا، شامل تنظیم مثبت رونویسی توسط RNA پلیمراز II، تنظیم

سیکل سلولی، پاسخ سلولی به کمبود گلوکز و فرآیندهای آپوپتوزی می‌باشد (شکل ۴- ب). همچنین عملکردهای مولکولی مشخص شده در خصوص ژن‌های مشترک، شامل اتصال به توالی DNA در نواحی سیس، فعالیت ترانسپورترهای کاتیونی، اتصال پروتئین-های کینازی، فعالیت میتوزی و فعالیت‌های MAP کینازی می‌باشد (شکل ۴- ج). اجزای سلولی درگیر در عملکرد ژن‌های مشترک شامل ارگانل‌های متصل به غشاء درون سلولی، هسته و کمپلکس‌های کینازی وابسته به سیکلین و غشاء هسته‌ای می‌باشد (شکل ۴- د).



شکل ۴- آنالیز غنی‌سازی GO و مسیرهای KEGG. الف) مسیرهای پیام‌رسانی بر اساس پایگاه KEGG. ب) آنالیز GO برای فرآیندهای بیولوژیکی، ج) آنالیز GO برای عملکردهای مولکولی، د) آنالیز GO برای اجزای سلولی.

گروه‌های ژنی بر اساس افزونه MCODE در نرم‌افزار به‌دست آمدند. MCODE یک افزونه برای یافتن خوشه‌ها و یا نواحی بسیار مرتبط در یک شبکه PPI می‌باشد. علاوه بر این برای مشخص کردن ژن‌های کلیدی از افزونه CytoHabba استفاده شد (شکل ۵-ب). ژن‌های کلیدی انتخاب شده مطابق با آنالیز MCC در نرم‌افزار Cytoscape شامل BUB1, CCNB1, BIRC5, FOXM1, MKI67, KIF20A, ZWINT, NCAPH و ASF1B بودند.



شکل ۵-الف) ماژول‌های مشخص شده در آنالیز شبکه PPI از ژن‌های مشترک بر اساس بیشترین اتصالات و ارتباط با پروتئین-های دیگر. ب) ژن‌های کلیدی گزینش شده در مطالعه که توسط افزونه CytoHabba مشخص شده‌اند. ژن‌های کلیدی بر اساس امتیاز از بالاترین امتیاز (رنگ قرمز) تا پایین‌ترین امتیاز (رنگ زرد) مشخص شده‌اند.

وارد شدند و بیان آن‌ها مشخص شد. مطابق با شکل ۶، میزان بیان تمامی ژن‌های کلیدی شناسایی شده به‌صورت افزایش بیان در سرطان سرویکس مشخص شد. این افزایش بیان در تمامی ژن‌ها به‌صورت معنادار بوده و درگیری این ژن‌ها در فرآیند سرطان‌زایی را تأیید می‌کند.

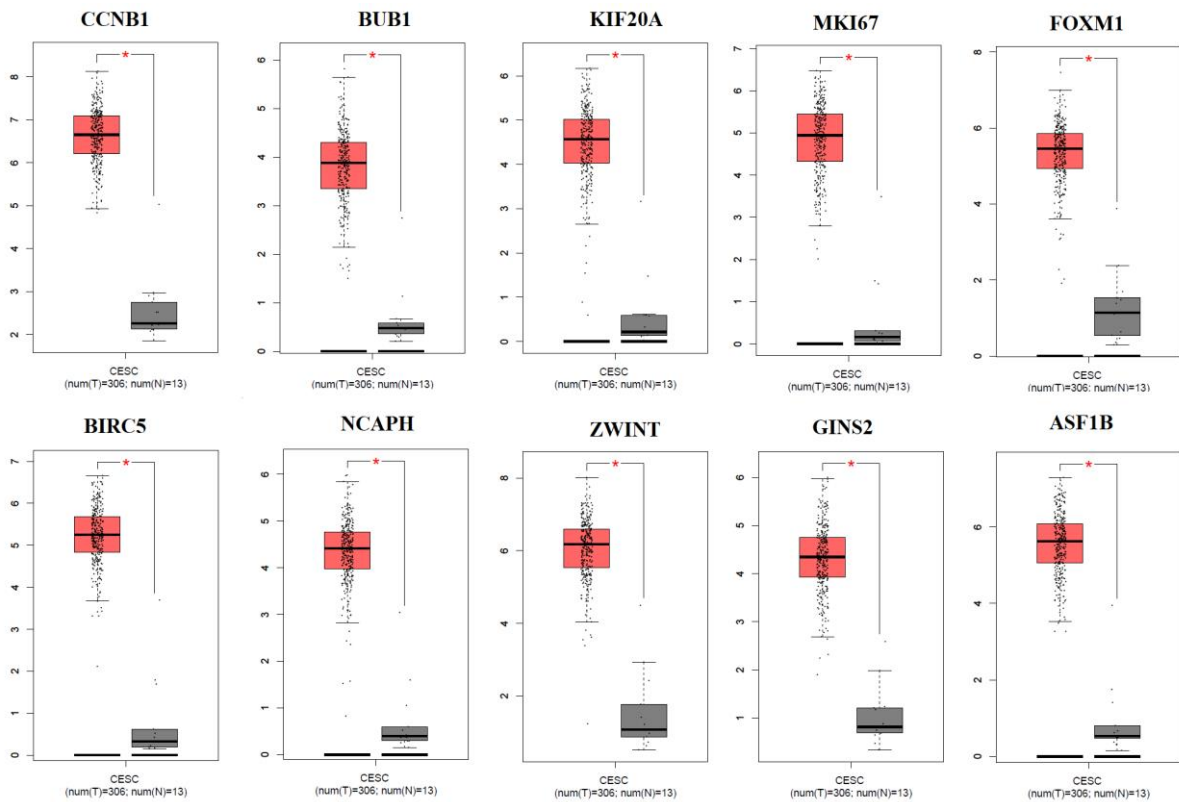
شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین و مشخص کردن ژن‌های کلیدی

اطلاعات تعامل بین ژن‌های مشترک و شبکه میانکنش پروتئین-پروتئین (PPI)، با استفاده از پایگاه داده STRING به‌دست آمد. در شبکه رسم شده برای ژن‌های مشترک، تعداد ۳۴۱ گره و ۱۳۵۵ یال با درجه ۷٫۹۵ رسم شد. شبکه ساخته شده در پایگاه داده توسط نرم‌افزار Cytoscape آنالیز شد و تعداد ۶ گروه ژنی با بالاترین امتیاز از این شبکه به‌دست آمد (شکل ۵-الف).

بیان ژن‌های کلیدی

به‌منظور مشخص کردن میزان بیان ژن‌های کلیدی از پایگاه GEPIA استفاده شد. در این پایگاه، مبنای مقایسه بین دو حالت توموری و سالم از داده‌های مربوط به پایگاه اطلس ژنوم سرطان (TCGA) می‌باشد. تمام ژن‌های کلیدی انتخاب شده در این پایگاه

¹ Node
² Edge



شکل ۶- بیان ژن‌های کلیدی مشخص شده در آنالیز، بر اساس اطلاعات مربوط به پایگاه داده GEPIA. با توجه به شکل، رنگ، قرمز نشان‌دهنده نمونه‌های توموری و رنگ خاکستری نشان‌دهنده نمونه‌های سالم است.

پیش‌بینی داروهای درمانی

در بررسی میانکنش ژن‌های کلیدی با داروهای تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا، تعداد ۱۰ دارو بالاترین امتیاز مشخص شد. داروی هوموهارینگتونین، یک مشتق گیاهی با خاصیت ضدسرطانی تأیید شده است که برای درمان سرطان‌های مختلف استفاده می‌شود. داروی دیگر با امتیاز بالا، سولینداک است که یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی می‌باشد و دارای اثرات سمیت سلولی است. رومیدپسین، داروی شیمیایی ضدسرطان بوده که در درمان لنفوم کاربرد دارد و

هنگامی که درمان‌های دیگر پاسخ نمی‌دهد، از این دارو استفاده می‌شود. فلوتامید به گروهی از داروهای ضدآندروژن تعلق دارد. این دارو سبب مهار اثر هورمون‌های مردانه (آندروژن) مانند تستوسترون می‌شود. سلول‌های سرطانی پروستات برای تکثیر خود به هورمون تستوسترون نیاز دارند. داروی فلوتامید با مهار اثر این هورمون می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی را مهار کند. جدول ۲، داروهای پیش‌بینی شده برای ژن‌های هدف کلیدی را با امتیاز و میزان معناداری مشخص کرده است.

جدول ۲- تعداد ۱۰ داروی پیش‌بینی شده با امتیاز بالا در بررسی میانکنش ژن‌های کلیدی- داروهای تأیید شده

نام دارو	نام ژن مربوطه	P-value	Combined score	Odds Ratio
هوموهارینگتونین	<i>BIRC5</i>	۰٫۰۰۲۴۹۸	۳۳۲۶۷۷	۵۵۵٫۱۷
سونیتینیب	<i>CCNB1</i>	۰٫۰۰۸۹۶۶	۶۱۵٫۴۳	۱۳۰٫۵۴
رومیدپسین	<i>BIRC5</i>	۰٫۰۰۹۴۶۲	۵۷۴٫۵۷	۱۲۳٫۲۸
فلوتامید	<i>BIRC5, CCNB1</i>	۰٫۰۰۹۹۵۷	۵۳۸٫۳۴	۱۱۶٫۷۹
لاپاتینیب	<i>BIRC5</i>	۰٫۰۱۳۹۲	۳۵۱٫۱۸	۸۲٫۱۵

۷۶,۴۸	۳۲۱,۶۹	۰,۰۱۴۹۰	<i>GINS2</i>	ابی روبیسین
۵۹,۹۲	۲۳۷,۹۸	۰,۰۱۸۸۴	<i>BIRC5</i>	ترتینوتین
۵۴,۹۲	۲۳۷,۹۸	۰,۰۱۸۸۴	<i>BIRC5</i>	بورسیت
۵۴,۰۶	۲۰۹,۳۵	۰,۰۲۰۸۱	<i>BIRC5, GINS2</i>	ایندومتاسین
۵۴,۰۶	۲۰۹,۳۵	۰,۰۲۰۸۱	<i>BIRC5</i>	تاندونیت

بحث

miRNAها یکی از مهم ترین گروه های ncRNA در تحقیقات بالینی هستند. از آنجایی که یک miRNA خاص ممکن است مسئول تنظیم برخی مسیرهای بیولوژیکی مختل شده در یک بیماری باشد، در نتیجه می توانند از نظر درمانی بسیار مفید باشند؛ به خصوص در شرایطی که بیماری با یک نقص ژنتیکی مرتبط نباشد. به این ترتیب نرم افزارهای بیوانفورماتیک مورد استفاده در شناسایی سایت های اتصال miRNA به ژن های هدف و ردیابی مسیرهای بیولوژیکی درگیر در آنها، به همراه یک بستر آزمایشگاهی و مدل های تحقیقات *in vitro* و *in vivo*، به تسریع شناسایی عملکرد miRNAها در پزشکی بالینی کمک بسیاری کرده است (۱۵). در مطالعه حاضر، از استراتژی بیوانفورماتیکی برای شناسایی ژن های کلیدی و مسیرهای پیام رسانی در اگزوزوم های مشتق شده از سلول های سرطانی سرویکس با تمرکز بر روی نقش miRNAها و میانکنش آنها با ژن ها استفاده شد. چنین روش هایی می تواند در مرحله بعد با استفاده از رویکردهای آزمایشگاهی و تجربی مورد ارزیابی قرار بگیرد. روش های بیوانفورماتیک برای چنین هدفی می توانند به دو دسته تقسیم شوند: دسته اول استراتژی هایی هستند که از توالی و داده های ساختاری و ویژگی های فیزیکی شیمیایی استفاده می کنند، و دسته دوم روش هایی هستند که بر اساس ساخت شبکه شکل می گیرند. روش دوم می تواند ویژگی های ذاتی شبکه های بیولوژیکی مرتبط را ارائه دهد که اغلب توسط روش اول در نظر گرفته نمی شود (۱۶، ۱۷).

در مطالعه حاضر، مجموعه داده GSE128803 برای شناسایی miRNA های دارای تغییر بیان در اگزوزوم های مشتق شده از سلول های سرطانی سرویکس آنالیز شد. در این آنالیز، تعداد قابل توجهی از miRNA های دارای تغییر بیان با معناداری بالا

مشخص شدند. از بین این تعداد، مواردی که از حد آستانه منفی ۵ و مثبت ۵ بالاتر بودند، برای ادامه آنالیزها انتخاب شدند. در بررسی مشخص شد که ژن های هدف این miRNAها در مسیرهای مهم سلولی درگیر در سرطان نقش دارند، بنابراین، این احتمال وجود دارد که miRNA های شناسایی شده بتوانند نقش بیومارکری را ایفا کنند.

از طرفی آنالیز mRNA های مربوط به اگزوزوم های مشتق شده از سلول سرطانی سرویکس نیز انجام شد. با بررسی اشتراک بین ژن های دارای تغییر بیان با ژن های هدف پیش بینی شده، مسیرهای مختلفی در اگزوزومها آشکار شدند، که می توانند نشان دهنده نقش پررنگ این وزیکول های خارج سلولی در فرآیند سرطان زایی باشد. یکی از مسیرهایی که توسط ژن های مشترک شناسایی شد، مسیر پیری سلول و پیام رسانی P53 می باشد که دارای ارتباط نزدیکی با یکدیگر هستند (۱۸). پیری سلول به عنوان توقف در رشد غیرقابل برگشت تعریف می شود که با تغییر مورفولوژی، الگوی بیان ژنی و همچنین آسیب به DNA مشخص می شود. پیری، نقش دوگانه ای در سرطان دارد؛ در ابتدا به عنوان یک سرکوب کننده تومور برای جلوگیری از تکثیر سلول های آسیب دیده عمل می کند (۱۹). مکانیسم های مهمی که سبب توقف در تکثیر سلول های تغییر یافته از نظر ژنوم می شوند شامل فعال شدن P53 و ATM می باشد. از طرف دیگر فعال شدن انکوژن ها به عنوان یک استرس ژنتیکی عمل می کند و با کمک فاکتورهای پایین دست، سبب پیری سلول می شود و به این ترتیب پیری به عنوان یک سرکوب کننده تومور قوی، از تبدیل سلول های دارای انکوژن فعال به حالت بدخیم ممانعت می کند (۲۰). مسیر دیگری که در آنالیز ژن ها مشخص شد، مسیر FoxO می باشد. پروتئین های FoxO به عنوان فاکتورهای رونویسی، نقش بسیار مهمی در فرآیندهای

بیولوژیکی مانند متابولیسم، تکثیر، تمایز سلولی، مهاجرت، آپوپتوز و تهاجم سلولی دارند (۲۱). تغییر در بیان این پروتئین‌ها یا به دلیل جهش‌های ژنتیکی، تغییرات پس از ترجمه و یا miRNAهای کد شده توسط ویروس می‌باشد. تغییرات بیان سبب تکثیر، متاستاز، سرکوب ایمنی در سرطان‌های ناشی از ویروس و مقاومت سلول‌ها به شیمی‌درمانی می‌شود. بنابراین در سرطان‌هایی که انکوویروس‌ها نقش قابل توجهی دارند (مانند سرطان سرویکس)، پروتئین‌های FOX می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای پیش‌آگهی و هدف‌های درمانی در نظر گرفته شوند (۲۲). علاوه بر مسیرهای مهمی مشخص شده در این آنالیز، ژن‌های کلیدی نیز مشخص شدند که می‌توانند در فرآیند تومورزایی و درمانی مؤثر باشند.

یکی از ژن‌های کلیدی مشخص شده در این آنالیز، ژن *CCNB1* می‌باشد. مطالعات مختلف، نقش انکوژنیک *CCNB1* را در انواع سرطان‌ها از جمله سرطان سرویکس شناسایی کرده‌اند (۲۳). علاوه بر این *CCNB1* یک فاکتور پیش‌آگهی دهنده برای بقا کلی ارائه شده است (۲۴). پروتئین *CCNB1*، به‌عنوان هدف پایین‌دست STAT3 می‌باشد که یک ژن کلیدی در تکثیر و تمایز سلول‌های سرطان سرویکس شناخته شده است. با حذف ژن STAT3، بیان *CCNB1* کاهش یافته و علاوه بر این تکثیر ژنوم ویروس HPV کاهش می‌یابد و به‌دنبال آن کاهش در فعالیت سلول‌های سرطانی سرویکس مشاهده می‌شود (۲۵). یکی دیگر از ژن‌های کلیدی در این مطالعه، *FOXMI* است. ژن *FOXMI*، به‌عنوان یک فاکتور رونویسی وابسته به تکثیر شناخته شده است که تکثیر سلولی را تحریک می‌کند. این ژن به‌عنوان یک فاکتور انکوژنی، در شروع و پیشرفت سرطان نقش دارد (۲۶). علاوه بر این افزایش بیان *FOXMI* سبب ایجاد فنوتیپ بدخیمی می‌شود و این اثر خود را از طریق تنظیم مستقیم *CCNB1* القاء می‌کند (۲۷). ژن مهم دیگری که در ژن‌های کلیدی مشخص شد، ژن *BIRC5* می‌باشد که پروتئین سوروین را کد می‌کند. این پروتئین در اغلب سرطان‌ها دارای افزایش بیان است و در مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر سلولی نقش دارد (۲۸). به‌دلیل این نقش در

سرطان‌زایی مولکول‌های کوچک زیادی برای مهار این پروتئین به‌عنوان هدف درمانی پیشنهاد شده است. در مطالعه حاضر نیز در بررسی میانکنش بین ژن‌ها و داروهای ضد سرطان، ۹ دارو از داروهای پیش‌بینی شده با ژن *BIRC5* دارای میانکنش هستند. این داروها شامل داروهای مشتق شده از گیاهان مانند هوموهارینگتونین و یا داروهای شیمی‌درمانی مانند فلوتامید و ایندومتاسین می‌باشند. یکی دیگر از ژن‌های کلیدی که میانکنش دارویی با آن مشخص شد، ژن *MKI67* می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند این ژن که به‌عنوان *Ki-67* نیز شناخته می‌شود، دارای ارتباط قوی با درجه توموری و بقا کلی در سرطان سرویکس می‌باشد (۲۹). ژن *MKI67* می‌تواند به‌عنوان فاکتور تشخیصی در بالین و هدف درمانی سرطان سرویکس باشد. داروی سونیتینیب به‌عنوان یک مهارکننده کینازی، با ژن *MKI67* میانکنش نشان داد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در مجموع با هدف استفاده از ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی برای شناسایی فاکتورهای مهم در اگزوزوم‌های مربوط به سلول‌های سرطانی سرویکس انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، آنالیز بیان ژن در زیرگروه‌های مختلف مولکولی (mRNA و miRNA)، نشان‌دهنده اهمیت ژن‌های انتخاب شده در وزیکول‌های خارج سلولی می‌باشد. با توجه به اهمیت سرطان سرویکس در بین سرطان‌های زنان و نرخ بالای مرگ‌ومیر به‌دلیل این سرطان، مطالعات مربوط به بررسی نشانگرهای زیستی اهمیت خاصی پیدا کرده است. در این میان، اگزوزوم‌ها در تشخیص و پیش‌آگهی بیماری‌ها مورد توجه بسیاری از مطالعات هستند. اگزوزوم‌ها می‌توانند فاکتورهای ژنتیکی مختلفی مانند miRNA را در درون خود محصور کرده و آنها را به سلول‌های دیگری انتقال دهند، بنابراین از تخریب و حذف شدن مصون می‌مانند. به‌همین دلیل عملکردهای miRNAها در تکوین سرطان قابل تأمل است. بنابراین برای مطالعات بعدی بهتر است سایر RNAهای غیرکدکننده مانند lncRNAها نیز بررسی گردد.

خود، باعث بهبود سطح کیفی و افزایش غنای مقاله شده‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از داوران گرانقدر و سردبیر محترم مجله زنان، مامایی و نازایی ایران که با رهنمودهای ارزنده

منابع

1. D'Oria O, Corrado G, Laganà AS, Chiantera V, Vizza E, Giannini A. New advances in cervical cancer: from bench to bedside. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022; 19(12):7094.
2. Kashyap N, Krishnan N, Kaur S, Ghai S. Risk factors of cervical cancer: a case-control study. *Asia-Pacific journal of oncology nursing* 2019; 6(3):308-14.
3. Wang J, Wang T, Yang YY, Chai YL, Shi F, Liu ZI. Patient age, tumor appearance and tumor size are risk factors for early recurrence of cervical cancer. *Molecular and clinical oncology* 2015; 3(2):363-6.
4. Achen MG, McColl BK, Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer cell* 2005; 7(2):121-7.
5. Nahand JS, Taghizadeh-boroujeni S, Karimzadeh M, Borran S, Pourhanifeh MH, Moghoofei M, et al. microRNAs: new prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. *Journal of cellular physiology* 2019; 234(10):17064-99.
6. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006):350-5.
7. Vishnoi A, Rani S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview. *MicroRNA profiling: Methods and protocols* 2017: 1-10.
8. Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, Kinose Y, Nakatsuka E, Kimura T. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in ovarian cancer. *Molecular cancer* 2016; 15(1):1-10.
9. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 2009; 9(21):4997-5000.
10. Lässer C, Seyed Alikhani V, Ekström K, Eldh M, Torregrosa Paredes P, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of translational medicine* 2011; 9(1):1-8.
11. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry* 2010; 56(11):1733-41.
12. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet* 2002; 360(9329):295-305.
13. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 2015; 13(1):17-24.
14. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2008; 110(1):13-21.
15. Hanna J, Hossain GS, Kocerha J. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. *Frontiers in genetics* 2019; 10:478.
16. Zhang H, Liang Y, Han S, Peng C, Li Y. Long noncoding RNA and protein interactions: from experimental results to computational models based on network methods. *International journal of molecular sciences* 2019; 20(6):1284.
17. Jiang L, Hong L, Yang W, Zhao Y, Tan A, Li Y. Co-expression network analysis of the lncRNAs and mRNAs associated with cervical cancer progression. *Archives of Medical Science* 2019; 15(3):754-64.
18. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules* 2020; 10(3):420.
19. Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Current pharmaceutical design* 2010; 16(1):79-100.
20. Wang T, Wu X, Song Y, Cheng H. Curcumin induces G2/M arrest and triggers autophagy, ROS generation and cell senescence in cervical cancer cells. *Journal of Cancer* 2020; 11(22):6704.
21. Jiramongkol Y, Lam EW. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2020; 39:681-709.
22. Ramezani A, Nikravesh H, Faghiloo E. The roles of FOX proteins in virus-associated cancers. *Journal of Cellular Physiology* 2019; 234(4):3347-61.
23. Bai X, Wang W, Zhao P, Wen J, Guo X, Shen T, et al. lncRNA CRNDE acts as an oncogene in cervical cancer through sponging miR-183 to regulate CCNB1 expression. *Carcinogenesis* 2020; 41(1):111-21.
24. Niméus-Malmström E, Koliadi A, Ahlin C, Holmqvist M, Holmberg L, Amini RM, et al. Cyclin B1 is a prognostic proliferation marker with a high reproducibility in a population-based lymph node negative breast cancer cohort. *International journal of cancer* 2010; 127(4):961-7.
25. Morgan EL, Wasson CW, Hanson L, Kealy D, Pentland I, McGuire V, et al. STAT3 activation by E6 is essential for the differentiation-dependent HPV18 life cycle. *PLoS pathogens* 2018; 14(4):e1006975.

26. Nandi D, Cheema PS, Jaiswal N, Nag A. FoxM1: repurposing an oncogene as a biomarker. In *Seminars in Cancer Biology* 2018; 52:74-84.
27. Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H, Katoh M. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters* 2013; 328(2):198-206.
28. Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC cancer* 2022; 22(1):1-13.
29. Xia L, Su X, Shen J, Meng Q, Yan J, Zhang C, et al. ANLN functions as a key candidate gene in cervical cancer as determined by integrated bioinformatic analysis. *Cancer management and research* 2018: 663-70.